



FR 98 01717



REC'D 21 SEP 1998
WIPO PCT

0914860375

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 AOUT 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

SIEGE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

20 AVR. 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 05269

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

LY

DATE DE DÉPÔT

20 AVR. 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire

certificat d'utilité

transformation d'une demande de brevet européen



brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

MILIEUX DE CULTURE ET D'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DE DIFFERENTES ESPECES DE CANDIDA ET PROCEDES D'ANALYSE

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

BIO MERIEUX

SA

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

Pays

Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

FRANCE

97 10635

20 Août 1997

1717

7 DIMSIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Dominique GUERRE
CPI 921104

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

D. GIRAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

980 5269

TITRE DE L'INVENTION :

Milieux de culture et d'identification spécifique de différentes espèces
de Candida et procédés d'analyse

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 6153
69466 LYON CEDEX 06

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ORENGA Sylvain
Saint-André
01160 NEUVILLE-SUR-AIN

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 20 Avril 1998

Dominique GUERRE
CPI 921104

[Handwritten signature]

DESCRIPTION

La présente invention concerne un milieu de culture et d'identification spécifique de levures et un procédé d'analyse microbiologique pour identifier spécifiquement les levures *Candida albicans* et *Candida tropicalis* et/ou différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*.

L'espèce *C. albicans* est la plus communément isolée à partir d'échantillons cliniques et provoque des infections plus ou moins importantes de la peau, des ongles et des muqueuses chez les individus présentant des défenses immunitaires normales et des infections très sérieuses chez les individus affaiblis et notamment ceux infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Selon les études *C. tropicalis* est la deuxième ou troisième espèce en fréquence d'isolement dans les prélèvements d'origine humaine. Il est donc essentiel non seulement de pouvoir détecter très rapidement la présence de ces levures dans des prélèvements, mais également de différencier celles appartenant à l'espèce *C. albicans*, de celles de l'espèce *C. tropicalis*.

Pour cela, il a été proposé ces dernières années de nombreuses techniques pour identifier rapidement les levures *C. albicans*. Le plus grand nombre d'entre elles est basé sur la mise en évidence d'une activité hexosaminidase, c'est-à-dire d'enzymes ayant une activité *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase ou *N*-acétyl- β -D-galactosaminidase ou *N*-acétyl- β -D-mannosaminidase (FR-2 684 110, FR-2 659 982). Néanmoins ces procédés souffrent d'une spécificité réduite vis-à-vis des levures de l'espèce *C. tropicalis*.

Les inventeurs de la présente invention ont découvert qu'en inhibant une activité enzymatique de l'espèce *C. tropicalis*, notamment l'activité hexosaminidase, il était possible de pallier aux inconvénients des tests précités et ainsi d'apporter un moyen d'identification et/ou de différenciation des levures, notamment de *C. albicans* et *C. tropicalis*, rapide et peu coûteux.

Par ailleurs, l'activité enzymatique glucosidase à déjà fait l'objet de recherches par certains documents, comme Casal, M. et Linares, M.J. « Contribution to the study of the enzymatic profiles of yeast organisms with medical interest » *Mycopathologie*

81,155-159 (1983). Cette activité est positive chez quelques souches de *C. albicans*, *C. tropicalis* et *Candida pseudotropicalis* (appelé aujourd'hui *Candida kefyr*), mais négatives pour les autres *Candida*, par exemple *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*.

Il est donc apparu intéressant d'essayer de cumuler, dans un même milieu, la possibilité de rechercher deux activités enzymatiques différentes, c'est-à-dire hexosaminidase et glucosidase. Or on constate que, dans les milieux selon l'invention, ce cumul permet de différencier plus précisément les *C. albicans* par rapport aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* et par rapport aux autres *Candida*, mais également de différencier les *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*.

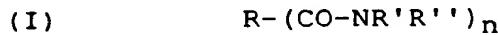
Bien entendu, il est prévu d'associer, dans un même milieu, aux substrats spécifiques des activités hexosaminidase et glucosidase, que l'on recherche, un inhibiteur selon l'invention, et même un activateur de l'activité hexosaminidase.

L'objet de l'invention est donc un milieu de culture et d'identification spécifique de levures comprenant un substrat chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, caractérisé en ce que le milieu comprend en outre au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de *Candida tropicalis*.

Grâce à l'invention, le milieu de culture permet notamment l'identification spécifique des levures de l'espèce *C. albicans* et/ou *C. tropicalis*.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I) :

30



dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

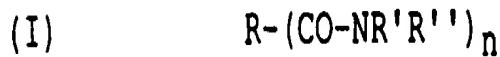
35

- un atome d'hydrogène,

- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne
5 hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
et de deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou égal à 1.

Selon l'invention, par une chaîne hydrocarbonée "comportant" au moins un hétéroatome, on entend que la chaîne
10 hydrocarbonée peut être substituée par au moins un substituant tel que notamment -NH₂, -COOH, -SH, et un atome d'halogène, et/ou peut être interrompue par au moins un hétéroatome tel que notamment O, S, et N.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention,
15 le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I):



dans laquelle, premièrement, R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- un atome d'hydrogène,
- une chaîne hydrocarbonée aliphatique,

5 et, deuxièmement, n est égal à 1 ou 2.

Selon un mode de réalisation très préférentiel de l'invention, le composé sélectivement inhibiteur est une acétamide.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend un activateur spécifique de l'enzyme 10 hexosaminidase de *C. albicans*.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase est la N-acétyl-glucosamine.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend un mélange de composés sélectivement 15 inhibiteurs.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le mélange de composés sélectivement inhibiteurs est constitué d'acétamide et de formamide.

20 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu est liquide ou gélifié.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture est gélifié et comprend pour 1 litre :

	- peptones ou mélange de peptones	0,01-40 g
25	- extrait de levure	0,01-40 g
	- glucose (source de carbone)	0-10 g
	- tampon phosphate (pH entre 5 et 8,5)	2,5-100 mM
	- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-	
	β-D-glucosaminide	20-600.10 ⁻⁶ M
	- acétamide	0,01-20 g
	- inhibiteur de bactéries	0-20 g
30	- agar	11-20 g

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture gélifié ou liquide décrit ci-dessus comprend de plus de la N-acétyl-glucosamine à 1,0 g/l.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture gélifié ou liquide décrit ci-dessus comprend de plus de la formamide à 0,5 g/l.

Un autre objet de l'invention est un procédé d'analyse 5 microbiologique pour identifier sélectivement les levures *C. albicans* et/ou *C. tropicalis* et/ou différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*, caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon à analyser au contact d'au moins un milieu d'identification décrit ci-dessus.

10 A cet effet la présente invention concerne également un milieu pour la détection et l'identification spécifique de levures, qui est caractérisé par le fait qu'il comprend deux substrats, un premier substrat, chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, et un second 15 substrat, chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des glucosidases.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, dans ce milieu, chaque substrat est constitué d'une partie spécifique de 20 l'enzyme et d'une partie marqueur, caractérisé par le fait que la partie marqueur du premier substrat est différente de la partie marqueur du second substrat.

Un autre mode préféré de réalisation de l'invention.

espèces de levures *Candida*, qui est caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon en contact avec un milieu selon l'une quelconque des revendications 13 ou 18, que l'on attend que des colorations apparaissent dans le milieu et que l'on identifie, par 5 des différences de colorations, les *C. albicans* par rapport, d'une part, aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* et, d'autre part, aux autres *Candida*, ainsi que les *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*.

10 L'on attend entre 36 et 60 heures et avantageusement sensiblement 48 heures, lorsque le milieu ne contient pas d'activateur ou d'inhibiteur.

L'on attend entre 18 et 30 heures et avantageusement sensiblement 24 heures, lorsque le milieu contient un activateur ou 15 un inhibiteur.

Selon un premier mode de réalisation, ces procédés permettent d'identifier *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient :

20 - un substrat d'hexosaminidase, et/ou
 - un substrat de glucosidase, et/ou
 - un activateur d'hexosaminidase, et/ou
 - inhibiteur d'hexosaminidase.

Selon un deuxième mode de réalisation, ces procédés 25 permettent d'identifier *C. albicans* par rapport aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* et/ou aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient : -

- un substrat d'hexosaminidase et un substrat de glucosidase, et/ou
 30 - un activateur d'hexosaminidase, et/ou
 - inhibiteur d'hexosaminidase.

Par "composé sélectivement inhibiteur de l'activité de l'hexosaminidase de *C. tropicalis*", on entend tout composé capable d'inhiber de manière sélective l'activité de l'hexosaminidase de 35 *C. tropicalis*. Par exemple, les composés de type amide de formule décrite ci-dessus ont la propriété d'inhiber spécifiquement

l'activité hexosaminidase des *C. tropicalis*, sans affecter celle des *C. albicans*.

Par "identification", on entend la détection et/ou la quantification.

5 Par "échantillon", on entend notamment tout prélèvement de type biologique, une souche ou un ensemble de souches de levure isolées par exemple après culture.

On expose ci-après, de manière générale la composition du milieu de culture, exprimée en g/l de milieu final.

10 Le milieu comprend une base nutritive nécessaire au développement des levures et des inhibiteurs spécifiques de l'hexosaminidase des *C. tropicalis* selon l'invention.

Les éléments constitutifs de la base nutritive comprennent :

15 - des peptones de 0,01 à 40 g/l, telles que la peptone de viande, le produit commercialisé par la société bioMérieux sous la marque bioSoyase ou analogue, ou encore un mélange de peptones ; de préférence, la peptone ou le mélange de peptones est présent dans le milieu à environ 6 g/l + 0,5 g/l ;

Le substrat chromogène ou fluorogène peut être tout substrat chromogène ou fluorogène hydrolysable par une hexosaminidase, telle qu'une galactosaminidase, glucosaminidase ou mannosaminidase, pour libérer un produit coloré ou fluorescent. De 5 préférence, le substrat est choisi parmi ceux présentant une forte coloration ou fluorescence avec peu de molécules, et n'induisant pas de modification du métabolisme des microorganismes, excepté pour l'activité enzymatique recherchée. Ces substrats sont de préférence choisis, pour les substrats chromogènes, parmi ceux comprenant un 10 groupement chromophore tel qu'un indolyle substitué ou non, et notamment parmi le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-galactosaminide, 6-Chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide ou le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide de 20 à 600 15 mM, avantageusement le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide à 200 mM, et pour les substrats fluorogènes, parmi la 4-Méthylumbelliféryl-N-acétyl-β-D-galactosaminide, la 4-Méthylumbelliféryl-N-acétyl-β-D-glucosaminide.

L'inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase des levures de 20 l'espèce *C. tropicalis* est choisi préférentiellement dans le groupe des composés de type amide (I) ou leurs mélanges. Il est notamment choisi parmi les amides telles que la formamide, l'acétamide, la propionamide, la gycinamide, la succinamide, et autres. La quantité du composé de type amide est comprise entre 0,01 et 20 g/l. De 25 préférence l'inhibiteur choisi est l'acétamide à 1 g/l.

Afin d'obtenir pour les levures de l'espèce *C. albicans* une activité intense et précoce, il peut avantageusement être ajouté au milieu de culture un activateur d'hexosaminidase tel que décrit dans le document FR-A-2.684.110. De même un inhibiteur ou un mélange 30 d'inhibiteurs des bactéries, permettant d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif et de celles à Gram négatif, sans affecter celle des levures, et si possible des champignons, peut être ajouté au milieu. De préférence, les inhibiteurs de bactéries sont choisis dans le groupe des antibiotiques tels que gentamicine, 35 chloramphénicol, pénicilline, streptomycine, cycloheximide, néomycine, tétracycline, oxytétracycline ou un mélange

d'antibiotiques, et/ou parmi la tellurite, un molybdate et analogues, ou leurs mélanges. Avantageusement, on choisit le chloramphénicol (0,5 g/l), ou un mélange de gentamicine (0,1 g/l) et de chloramphénicol (0,05 g/l). Il est également possible d'inhiber 5 la croissance des bactéries en diminuant le pH du milieu jusqu'à un pH acide.

Comme cela est démontré par les exemples ci-après, la réaction d'hydrolyse enzymatique reste spécifique au delà de 24 10 heures d'incubation.

Exemple 1 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet de l'acétamide sur l'activité hexosaminidase des levures.

15 Deux milieux ont été préparés selon les techniques habituelles. Le premier milieu ci-après désigné Milieu I contient tous les éléments de la base nutritive, ainsi qu'un substrat chromogène d'une hexosaminidase et un mélange inhibiteur de bactéries.

20 La composition du Milieu I pour un litre de milieu final est la suivante :

- bioSoyase (bioMérieux) 6,0 g
- extrait de levure (bioMérieux) 1,5 g
- glucose (Merck) 1,0 g
- 25 - tampon phosphate (Merck) 10,0 mM
- Mn²⁺ (Merck) 1,0 mM
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl- -
- β-D-glucosaminide (Biosynth) 0,1 g
- gentamicine 0,1 g
- 30 - chloramphénicol 0,05 g
- agar (bioMérieux) 15,0 g

Le pH du milieu a été ajusté aux environs de 7.

Le second milieu appelé Milieu II correspond au milieu selon l'invention et contient tous les éléments ci-dessus décrits 35 pour le Milieu I, plus l'inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase

des *C. tropicalis*, c'est-à-dire un composé acétamide (Sigma) à 1,0 g.

Sur ces deux milieux, 12 souches de levures ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les souches provenant de la collection de la demanderesse, appartiennent aux espèces suivantes : *C. albicans* (3 souches), *C. glabrata* (2 souches), *C. krusei* (1 souche), *C. parapsilosis* (1 souche), *C. tropicalis* (3 souches), *Saccharomyces cerevisiae* (1 souche), *Trichosporon spp.* (1 souche). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations suivantes :

- les colonies bleues correspondent à des souches produisant la N-acétyl-β-D-glucosaminidase appartenant *a priori* à l'espèce *C. albicans* ;

- les colonies blanches correspondent aux souches ne produisant pas l'enzyme précitée ou dont cette enzyme est inhibée par le composé de type amide, elles appartiennent donc à d'autres espèces de levures qui seront alors à identifier à l'aide des techniques habituelles.

20

Les résultats sont présentés dans le tableau I ci-après :

TABLEAU I

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	I	1*	2	-	3	-	-
	II	1	2	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	I	-	-	2	-	-	2
	II	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	I	-	-	3	3	-	-
	II	-	-	3	-	1	2
<i>S. cerevisiae</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	I	-	-	1	1	-	-
	II	-	-	1	1	-	-

25

* : nombre de souches, "—" = 0

Comme cela ressort du tableau I ci-dessus, l'apport du composé de type amide permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans*, ainsi qu'une souche de *Trichosporon* après 48 heures d'incubation uniquement, produisent des colonies colorées sur le milieu selon l'invention. Les colonies de *C. tropicalis* qui sont bleues après 48 heures sur le Milieu I donnent des colonies incolores sur le Milieu II, sauf une très faiblement colorée après 48 heures d'incubation.

10

Exemple 2 :

L'expérience de l'exemple 1 a été reproduite mais en utilisant des milieux liquides au lieu de milieux gélifiés. Les milieux III et IV correspondent donc aux milieux I et II de l'exemple 1 mais sont dépourvus d'agar. Par ailleurs, la concentration du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide est de 150 mg/l de milieu final pour une utilisation en milieu liquide. Les milieux ont été répartis en ampoules en verre à raison de 3 ml par ampoule. Les souches étudiées sont les

TABLEAU II

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	III	1*	2	-	3	-	-
	IV	1	2	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	III	-	-	2	-	-	2
	IV	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	III	-	2	1	3	-	-
	IV	-	-	3	-	2	1
<i>S. cerevisiae</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	III	-	-	1	-	1	-
	IV	-	-	1	-	1	-

5

* : nombre de souches, "--" = 0

Comme cela ressort du tableau II ci-dessus, l'apport du composé amidé permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet après 24 heures d'incubation, seules les 10 souches de *C. albicans* donnent des tubes colorés en bleu dans le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui donnent des tubes colorés dans le Milieu III donnent des tubes incolores dans le Milieu IV. Après 48 heures d'incubation la coloration des tubes comportant des souches de *C. tropicalis* est également inhibée 15 ou au moins très fortement réduite.

Exemple 3 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet de l'acétamide sur l'activité hexosaminidase des levures en présence 20 d'un activateur spécifique de cette enzyme.

L'expérience de l'exemple 1 a été reproduite mais en ajoutant au milieu de la N-Acetyl-glucosamine. Les milieux V et VI correspondent donc aux milieux I et II de l'exemple 1 auxquels on a ajouté de la N-Acetyl-glucosamine à 1,0 g/l de milieu final. Les 25 souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 1. Elles ont été

directement cultivées en boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations de l'exemple 1.

5

Les résultats sont présentés dans le tableau III ci-après :

TABLEAU III

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	V	2*	1	-	3	-	-
	VI	2	1	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	V	-	-	2	-	-	2
	VI	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	V	-	-	3	3	-	-
	VI	-	-	3	-	-	3
<i>S. cerevisiae</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	V	-	-	1	1	-	-
	VI	-	-	1	1	-	-

10

* : nombre de souches, "—" = 0

Comme cela ressort du tableau III ci-dessus, l'apport du composé de type amide permet une détection spécifique des souches de 15 *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans*, ainsi qu'une souche de *Trichosporon* après 48 heures d'incubation uniquement, produisent des colonies colorées sur le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui sont bleues sur le Milieu V donnent des colonies incolores sur le Milieu VI. L'ensemble 20 de ces deux milieux permet donc également une identification spécifique des levures de l'espèce *C. tropicalis* puisqu'après 48 heures d'incubation, elles sont les seules à être positives sur le milieu V et négatives sur le milieu VI.

Exemple 4 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet d'un mélange de composés amidés sur l'activité hexosaminidase des levures en présence d'un activateur spécifique de cette enzyme.

5 L'expérience de l'exemple 3 a été reproduite mais en ajoutant au milieu VI de la formamide à 0,5 g/l de milieu final (milieu VIII), le milieu VII étant identique au milieu V de l'exemple 3. Les souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 3. Elles ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les boîtes 10 ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations de l'exemple 1.

Les résultats sont présentés dans le tableau IV ci-après :

15

TABLEAU IV

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	VII	2*	1	-	3	-	-
	VIII	2	1	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	VII	-	-	2	-	-	2
	VIII	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	VII	-	-	3	3	-	-
	VIII	-	-	3	-	-	3
<i>S. cerevisiae</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	VII	-	-	1	1	-	-
	VIII	-	-	1	-	1	-

* : nombre de souches, "—" = 0

20

Comme cela ressort du tableau IV ci-dessus, l'apport d'un second composé de type amide permet une détection encore plus spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans* produisent des colonies significativement colorées 25 sur le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui

sont bleues sur le Milieu VII donnent des colonies incolores sur le Milieu VIII et la souche de *Trichosporon* fortement colorée après 48 heures d'incubation sur le milieu VII ne l'est plus que très faiblement sur le milieu VIII.

5

Exemple 5 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'intérêt de combiner un substrat d'hexosaminidase et un substrat de β -glucosidase dans des milieux pour l'isolement et l'identification 10 des levures.

Au milieu I de l'exemple 1, il a été ajouté un substrat de β -glucosidase, le 6-Chloro-3-indolyl- β -D-glucoside, à 0,07 g/l (milieu IX). A ce milieu, il a été ajouté soit un activateur d'hexosaminidase (N-Acetyl-glucosamine) à 1g/l (milieu X), soit un 15 inhibiteur de l'hexosaminidase des *C. tropicalis* (Acétamide) à 1 g/l (milieu XI), soit une combinaison de l'activateur et l'inhibiteur précités aux mêmes concentrations (milieu XII).

Sur ces quatre milieux, dix-huit souches de levures ont été directement cultivées en boîtes de Pétri. Les souches, provenant de 20 la collection de la demanderesse, appartiennent aux espèces suivantes : *C. albicans* (3 souches), *C. glabrata* (2 souches), *C. guilliermondii* (2 souches), *C. kefyr* (2 souches), *C. krusei* (1 souche), *C. lusitaniae* (2 souches), *C. parapsilosis* (1 souche), 25 *C. tropicalis* (3 souches), *Saccharomyces cerevisiae* (1 souche), *Trichosporon spp.* (1 souche). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations suivantes :

- les colonies bleues correspondent à des souches 30 produisant la N-acétyl- β -D-glucosaminidase appartenant *a priori* à l'espèce *C. albicans* ;

- les colonies roses correspondent à des souches produisant la β -D-glucosidase appartenant *a priori* aux espèces *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, et *C. tropicalis* ;

35 - les colonies mauves correspondent à des souches

- les colonies blanches correspondent aux souches ne produisant aucune des enzymes précitées ou dont ces enzymes sont inhibées, elles appartiennent donc à d'autres espèces de levures qui seront alors à identifier à l'aide des techniques habituelles.

5 Les résultats sont présentés dans le tableau V ci-après :

TABLEAU V

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	IX	1-bleue	2-bleue	-	3-bleue	-	-
	X	2-bleue	1-bleue	-	3-bleue	-	-
	XI	1-bleue	2-bleue	-	3-bleue	-	-
	XII	2-bleue	1-bleue	-	3-bleue	-	-
<i>C. glabrata</i>	IX	-	-	2	-	-	2
	X	-	-	2	-	-	2
	XI	-	-	2	-	-	2
	XII	-	-	2	-	-	2
<i>C. guilliermondii</i>	IX	-	-	2	2-rose	-	-
	X	-	-	2	2-rose	-	2
	XI	-	-	2	2-rose	-	2
	XII	-	-	2	-	2-rose	2
<i>C. kefyr</i>	IX	-	2-rose	2	2-rose	-	2
	X	-	2-rose	2	2-rose	-	2
	XI	-	2-rose	2	2-rose	-	2
	XII	-	2-rose	2	2-rose	-	2
<i>C. krusei</i>	IX	-	-	1	-	-	1
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	-	1
<i>C. lusitaniae</i>	IX	-	-	2	1-rose	1-rose	2
	X	-	-	2	2-rose	-	2
	XI	-	-	2	1-rose	1-rose	2
	XII	-	-	2	2-rose	-	2
<i>C. parapsilosis</i>	IX	-	-	1	-	-	1
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	IX	2-rose	1-rose	-	2-mauve	1-rose	-
	X	2-rose	1-rose	-	2-mauve	1-rose	3
	XI	2-rose	1-rose	-	3-rose	-	3
	XII	2-rose	1-rose	-	3-rose	-	3
<i>S. cerevisiae</i>	IX	-	-	1	-	-	1
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	IX	-	-	1	1	-	-
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	1	-

* : nombre de souches-couleur des colonies, "—" = 0

Comme cela ressort du tableau V ci-dessus, l'apport d'une combinaison d'un substrat d'hexosaminidase et d'un substrat de β -glucosidase permet une détection d'un nombre plus important d'espèces de levure. En effet, il est possible sur les milieux selon 5 l'invention de distinguer les souches de *C. albicans* d'une part, celles de *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, et *C. tropicalis* de l'autre, des autres espèces de levures. Les milieux X, XI et XII, illustre l'intérêt d'associer cette combinaison de substrat à un activateur d'hexosaminidase, à un inhibiteur 10 spécifique de l'hexosaminidase des souches de *C. tropicalis* ou au mélange des deux. Sur le milieu X la détection des souches de *C. albicans* est plus rapide que sur le milieu IX, sur le milieu XI, la différence entre les souches de *C. albicans* et celles de *C. tropicalis* est plus nette et le milieu XII combine les avantages 15 des milieux X et XI.

REVENDICATIONS

1. Milieu de culture et d'identification spécifique de
 5 levures comprenant un substrat chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, caractérisé en ce que le milieu comprend en outre au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de *C. tropicalis*.

10

2. Milieu, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I) :

15

(I) $R-(CO-NR'R'')_n$

dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- un atome d'hydrogène,
- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

25 deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou égal à 1.

3. Milieu, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I) :

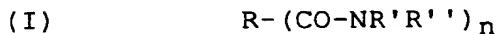
(I) $R-(CO-NR'R'')_n$

dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- un atome d'hydrogène,

- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome,
 soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne
 5 hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
 deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou égal à 1.

10 4. Milieu, selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I) :



15 dans laquelle, premièrement, R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :
 - un atome d'hydrogène,
 - une chaîne hydrocarbonée aliphatique,
 20 et, deuxièmement, n est égal à 1 ou 2.

5. Milieu, selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une acétamide.

25 6. Milieu, selon les revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase de *C. albicans*. -

30 7. Milieu, selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase est la N-acétyl-glucosamine.

35 8. Milieu, selon les revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange de composés sélectivement inhibiteurs.

9. Milieu, selon la revendication 8, caractérisé en ce que le mélange de composés sélectivement inhibiteurs est constitué d'acétamide et de formamide.

5 10. Milieu, selon les revendications 1 et 9,
caractérisé en ce que le milieu est gélifié et comprend pour 1 litre :

	- peptones ou mélange de peptones	0,01-40 g
	- extrait de levure	0,01-40 g
10	- glucose (source de carbone)	0-10 g
	- tampon phosphate (pH entre 5 et 8,5)	2,5-100 mM
	- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-	
	β-D-glucosaminide (Biosynth)	20-600.10 ⁻⁶ M
	- acétamide (Sigma)	0,01-20 g
15	- inhibiteur de bactéries	0-20 g
	- agar	11-20 g

11. Milieu selon les revendications 9 et 10 comprenant de plus de la N-acétyl-glucosamine à 1,0 g/l.

20

12. Milieu selon les revendications 10 et 12 comprenant de plus de la formamide à 0,5 g/l.

13. Milieu pour la détection et l'identification
spécifique de levures, caractérisé par le fait qu'il comprend
deux substrats, un premier substrat, chromogène ou fluorogène,
susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des
hexosaminidases, et un second substrat, chromogène ou
fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du
groupe des glucosidases.

14. Milieu, selon la revendication 13, dans lequel
chaque substrat est constitué d'une partie spécifique de
l'enzyme et d'une partie marqueur, caractérisé par le fait que
35 la partie marqueur du premier substrat est différente de la
partie marqueur du second substrat.

15. Milieu, selon l'une quelconque des revendications
13 ou 14, caractérisé par le fait qu'il comprend un activateur
et/ou un inhibiteur d'hexosaminidase.

5

16. Milieu, selon la revendication 15, caractérisé par
le fait que l'activateur est constitué par une hexosamine et/ou
une hexosaminidine et/ou que l'inhibiteur reprend les
caractéristiques de l'une quelconque des revendications 1 à 12.

10

17. Milieu, selon l'une quelconque des revendications
13 à 16, caractérisé par le fait que le substrat
d'hexosaminidinase est constitué par un dérivé d'indoxyl et/ou
que le substrat de glucosidase est constitué par un dérivé
15 d'indoxyl.

20

19. Procédé d'analyse microbiologique pour identifier
sélectivement la levure *C. albicans* et/ou *C. tropicalis* et/ou
différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*,
caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon à
25 analyser au contact d'au moins un milieu d'identification selon
l'une quelconque des revendications 1 à 12.

30

20. Procédé d'analyse microbiologique pour détecter et
identifier sélectivement certaines espèces de levures *Candida*,
caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon en
contact avec un milieu selon l'une quelconque des revendications
13 ou 18, que l'on attend que des colorations apparaissent dans
le milieu et que l'on identifie, par des différences de
colorations, les *C. albicans* par rapport, d'une part, aux
35 *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis*
et, d'autre part, aux autres *Candida*, ainsi que les

C. guilliermondii, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*.

21. Procédé, selon la revendication 20, caractérisé en 5 que l'on attend entre 36 et 60 heures et avantageusement sensiblement 48 heures, lorsque le milieu ne contient pas d'activateur ou d'inhibiteur selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16.

10 22. Procédé, selon la revendication 20, caractérisé en que l'on attend entre 18 et 30 heures et avantageusement sensiblement 24 heures, lorsque le milieu contient un activateur ou un inhibiteur selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16.

15 23. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisée en ce que l'on identifie *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient :

20 - un substrat d'hexosaminidase, et/ou
- un substrat de glucosidase, et/ou
- un activateur d'hexosaminidase, et/ou
- inhibiteur d'hexosaminidase.

25 24. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, caractérisée en ce que l'on identifie *C. albicans* par rapport aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* et/ou aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient :

30 - un substrat d'hexosaminidase et un substrat de glucosidase, et/ou
- un activateur d'hexosaminidase, et/ou
- inhibiteur d'hexosaminidase.

